

**REMARKS**

In the foregoing Listing of Claims, Applicants cancel claim 1 and amend claims 18 and 22 by further defining a method of inhibiting tyrosinase activity in a subject in need of preventing or alleviating spots and freckles created on skin or a method of ameliorating facial blood flow in a subject in need thereof, which comprises administering a composition comprising an effective amount of anthocyan for suppressing preventing or alleviating spots and freckles created on skin or for ameliorating facial blood flow to the subject. These aspects of Applicants' invention are described on page 5, lines 6-18; page 8, lines 12-17; and elsewhere in the Specification. Applicants respectfully request reconsideration and allowance of the inventions defined in claims 18-25 for reasons that follow.

Applicants desire to express thanks to Examiner Elli Peselev for the courtesies extended the undersigned in a telephone interview on January 22, 2010. During the interview, the foregoing amendments to claims 18 and 22 were discussed among other things including the alleged inherency of the presently claimed method within the teachings of Matsumoto (EP 1 208 755 A1). Examiner Peselev stated that amended claim 22 has a very good chance of patentability. With respect to amended claim 18, Examiner Peselev stated this claim has a good chance of patentability, but she would have to consider this matter further after a response is filed.

The Office Action included a single prior art rejection of claims 1 and 18-25 under 35 U.S.C. §102(b) as being anticipated by Matsumoto. Matsumoto was used to reject Applicants' claims in previous Office Actions. The Office Action took the position that Applicants' claimed tyrosinase inhibiting activity and amelioration of facial blood flow activity would have been inherent in the method disclosed by Matsumoto. In the foregoing amendments, Applicants

cancel claim 1. In addition, Applicants amend claim 18 by defining a method of inhibiting tyrosinase activity in a subject in need of preventing or alleviating spots and freckles created on skin, which comprises administering a composition comprising an effective amount of anthocyan for preventing or alleviating spots and freckles created on skin to the subject. Similarly, Applicants amend claim 22 by defining a method of ameliorating facial blood flow in a subject in need thereof, which comprises administering a composition comprising an effective amount of anthocyan for ameliorating facial blood flow to the subject. Applicants respectfully submit that the presently claimed method of inhibiting tyrosinase activity in a subject in need of preventing or alleviating spots and freckles created on skin and the presently claimed method of ameliorating facial blood flow in a subject in need thereof, which comprises administering a composition comprising an effective amount of anthocyan for preventing or alleviating spots and freckles created on skin or for ameliorating facial blood flow to the subject, are not and cannot be inherent within the teachings of Matsumoto. Therefore, the presently claimed methods as defined in claims 18-25 cannot be anticipated by Matsumoto within the meaning of 35 U.S.C. §102.

Applicants respectfully submit that the presently claimed use of inhibiting tyrosinase activity in a subject in need of preventing or alleviating spots and freckles created on skin as required in present claims 18-21 is not related to the uses of improving visual function, improving body fluidity, and/or lowering blood pressure as discussed in Matsumoto, and thus is a new use over Matsumoto.

Applicants speculate that the mechanism of inhibiting tyrosinase is as follows. When epidemic cells are irradiated with ultraviolet light, a signaling substance that enhances the synthesis of melanine is produced. The signaling substance binds to melanocytes. The

melanocytes are then activated and grow, and produce and activate tyrosinase that is a melanine-producing enzyme. The activated tyrosinase converts tyrosine to DOPA (dihydroxyphenylalanine) in a living body and then dopaquinone which stimulates the production of melanine is produced. Accordingly, inhibiting tyrosinase inhibits the production of DOPA and dopaquinone, which in turn inhibit the production of melanine. The attached Exhibit A (K. Ohhara et al., Functional Food, 2009, Vol. 2, No. 4, p. 383-386) shows the mechanism, especially in Fig. 3.

The teachings of Matsumoto never disclose nor suggest the tyrosinase-inhibiting activity of anthocyanin and any relationship between tyrosinase-inhibiting activity and the production of melanine in a subject in need of preventing or alleviating spots and freckles created on skin as required in present claims 18 to 21. In addition, these properties or functions of the inventions defined in claims 18 to 21 are not related to the uses of improving visual function, improving body fluidity, and/or lowering blood pressure as proposed by Matsumoto, and thus is a new use or utility over Matsumoto. At least for these reasons, Applicants respectfully submit that the inventions of claims 18 to 21 are not anticipated by Matsumoto, and thus, are patentable thereover.

Applicants' claims 22 to 25 are directed to a method of ameliorating facial blood flow in a subject in need thereof, which comprises administering a composition comprising an effective amount of anthocyan for ameliorating facial blood flow to the subject. This claimed use is not related to the uses of improving visual function, improving body fluidity, and/or lowering blood pressure as discussed in Matsumoto, and thus is a new use over Matsumoto.

At best, Matsumoto proposes that an anthocyanin-containing composition has a blood fluidity improvement function. However, the blood fluidity improvement function discussed in

Matsumoto is different from the function for improving facial blood flow that is required in the present claims. In particular, Matsumoto describes the blood fluidity effects in Example 12. Example 12 discloses "This fresh whole blood obtained by the collection of heparin was poured into a micro channel array (width 7  $\mu\text{m}$ , height 30  $\mu\text{m}$ , depth 4.5  $\mu\text{m}$ , and 8736 channels (Bloody 6-7, Hitachi Haramachi Electronics Co., Ltd.) at a water column difference of 20cm using MC-FAN (Santuri Kiko). The time necessary for 100  $\mu\text{l}$  to pass through was determined." That is, the "improving blood fluidity function" is evaluated by collecting blood measuring the time for blood to pass through the micro channel array. Attached Exhibit B is a copy of the catalogue of the MC-FAN used in the experiment of Example 12. Pages 2 and 4 of Exhibit B show the micro channel array. The width of the micro channel array is 7  $\mu\text{m}$ , which is the same as the diameter of a blood capillary. Page 2 of Exhibit B includes examples that describe how the analyzer is used. It is clear that the fluidity of blood component such as erythrocytes, leukocytes, and platelets was measured in Example 12 of Matsumoto. That is, the alleged "blood fluidity improvement function" of Matsumoto is a function to improve the fluidity of blood components such as erythrocytes, leukocytes, and platelets. Furthermore, Matsumoto describes, "That is, according to the present invention, diseases such as cerebral .... by affecting erythrocytes, leukocytes, and platelets as such in the blood to improve the fluidity of the blood itself, thereby lowering blood pressure rather than by vasoconstriction" in paragraph [0095] of EP 1208755 A1.

On the contrary, the blood flow improving function of the presently claimed inventions is based on vasodilatation effect on peripheral vessels. This function is significantly different from and unrelated to the blood fluidity improvement function discussed in Matsumoto.

The attached Exhibit C (Iwasaki-Kurashige et al., *Vascular Pharmacology* 44 (2006) 215-223) shows that blackcurrant concentrate which includes anthocyanin decreases peripheral vascular resistance that results in vasodilatation. Exhibit C illustrates the blood flow improving function required in claims 22-25. Furthermore, the presently claimed method has the advantageous effect of ameliorating facial blood flow within 15 minutes.

Accordingly, the claimed inventions in claims 18 to 21 are based on the newly found function of anthocyanin for improving facial blood flow, which function is not described nor inherent in Matsumoto. It is well established in the case law that the discovery of a new use for an old structure based on unknown properties of the structure might be patentable to the discoverer as a process of using. *In re Hack*, 245 F.2d 246, 248, 114 USPQ 161, 163 (CCPA 1957). In US patent practice, many patents have been issued for novel use of known substances. For example, minoxidil had been patented as a blood pressure-lowering drug (US 3,461,461). Then, the new effect of minoxidil for enhancing hair growth was discovered and minoxidil was patented as a hair growth stimulant (US 4,139,619). Applicants respectfully submit that the methods defined in claims 18-25 fall within this category of invention. Namely, the presently claimed method of inhibiting tyrosinase activity in a subject in need of preventing or alleviating spots and freckles created on skin and the presently claimed method of ameliorating facial blood flow in a subject in need thereof, which comprise administering a composition comprising an effective amount of anthocyanin for preventing or alleviating spots and freckles created on skin or for ameliorating facial blood flow to the subject, are new uses for the compounds set forth in the present claims, which are not and cannot be inherent within the teachings of Matsumoto. At least for this reason, the inventions defined in claims 18-25, which are based on new uses of anthocyanin, are patentable.

At least for the foregoing reasons, Applicants respectfully submit that the presently claimed invention is patently distinguishable from Matsumoto. Therefore, Applicants respectfully request that the Examiner reconsider and withdraw any §102 or §103 rejection of method claims 18-25 over the teachings of Matsumoto.

Applicants believe that the foregoing is a complete and proper response to the Office Action mailed September 23, 2009. While it is believed that all pending claims in this application are in condition for allowance, if the Examiner has any comments or questions, Applicants invite the Examiner to telephone the undersigned to resolve any outstanding issues at the below listed number.

In the event this paper is not timely filed, Applicants hereby petition for an appropriate extension of time. The Commissioner is hereby authorized to charge the fee therefor, as well as any other fees which become due, to our Deposit Account No. 50-1147.

Respectfully submitted,

R. Eugene Varnell, Jr.  
R. Eugene Varnell, Jr.  
Attorney for Applicants  
Registration No. 29,728

Posz Law Group, PLC  
12040 South Lakes Drive, Suite 101  
Reston, VA 20191  
Phone 703-707-9110  
Customer No. 23400

ATTACHMENTS:

EXHIBIT A ~ K. Ohhara et al., Functional Food, 2009, Vol. 2, No. 4, p. 383-386 (5 pp.).

EXHIBIT B ~ Catalogue of MC-FAN (4 pp.).

EXHIBIT C ~ Iwasaki-Kurashige et al., Vascular Pharmacology 44 (2006) 215-2236 (6 pp.).

Exhibit A  
Partial English translation of K. Ohhara et al., *Functional Food*, 2009, Vol.2, No.4, p.383-386

Partial translation of K. Ohhara et al., *Functional Food*, 2009, Vol.2, No.4, p.383-386

Special topic Aging of skin and functional food

6. Effects of functional components in food for improving and preventing spots and cockles

Hiroki Ohhara<sup>1</sup>, Shingo TAJIMA<sup>2</sup>

1) Meiji Seika Kaisha, Ltd, Food and Healthcare Research Institute  
2) National Defense Medical College Hospital

Abstract

lines 6 to 8

It has been suggested that cassis-anthocyanin components which are transferred in blood inhibits tyrosinase activity which involves in producing melanine and ameliorating impaired blood circulation and takes effect on spots.

Figure 3 Hypothesis for effects of cassis-anthocyanin on improving and preventing spots

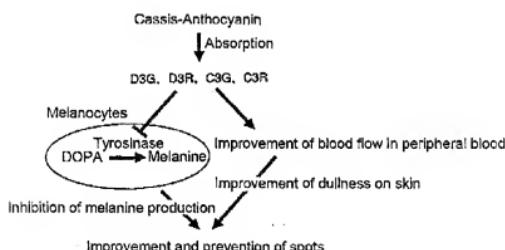


Exhibit A

page 1

(English)

## Exhibit A

## 特集 皮膚老化と機能性食品

6. 食品機能成分のシミ、シワの改善と  
予防効果大原 浩樹<sup>1)</sup> 多島 新吾<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 明治製菓株式会社 食料健康総合研究所  
<sup>2)</sup> 明治医科大学皮膚科医学講座

皮膚の老化に伴って発生するシミやシワを改善・予防することはQOL (quality of life) 向上にも重要なことである。近年、予防的な観点から食品機能成分の効果に対する効果について研究が進められ、その生理機能が明らかになってきている。そこで、我々はカシスアントシアニンとコラーゲンペプチドについて研究を進め、シミとシワの改善・予防効果を見出した。

カシスアントシアニンは、血中に移行したカシスアントシアニン成分がメラニン産生に関するチロシナーゼ活性を阻害し、さらに血流不全を改善することでシミに対する効果があることが示唆された。一方、コラーゲンペプチドは、血中に移行したHyp (ヒドロキシプロリン) 含有ペプチドが線維芽細胞の細胞外マトリクス産生に関与し、さらに表皮の水分低下、バリア機能低下を改善することでシワに対して効果があることが示唆された。

●キーワード 食品機能成分、シミ、シワ、カシスアントシアニン、コラーゲンペプチド



現在、高齢化社会のさらなる進展が推測され、皮膚病領域においても老化・加齢変化に関する研究が進められている。この皮膚の老化は、内因性老化と外因性老化に分

けられる。内因性老化とは生理性老化ともいい、各個人の遺伝子の素因を背景に生じる皮膚の加齢に伴う老化であり、形態的変化、機能的変化として表れる。一方、外因性老化とは内因性老化に環境因子、光禿禿、紫外線照射による光老化などの環境要因による皮膚障害のダメージが蓄積して生じる

Exhibit A  
page 2

### 1.1.5 皮肤老化与慢性性疾病

名である。外因性老化の光老化に関しては、日光に当たることの多い顔面などの露光部で顔蒼れがあり、シミ、シワなどの微細変化として表れる。この皮膚の老化に伴って発生するシミやシワを改善・予防することはQOL (quality of life) 向上の観点からも重要であり、近年、食品機能成分を用いた改善・予防効果の研究が精力的に進められている。

## 1. リンゴの改善と予防効果

シミは皮膚基底層に存在するメラノサイトから誘導される高分子色素メラニンが沈着し、発生したものである。メラニン産生の原因の一つとしては、紫外線照射が挙げられる。このメラニンは、メラノサイト内のメラノソームにおいてチロシナーゼが作用することで、チロシン、ドーパ(Dopa)、ドーパクロム(Dopachrome)を経て合成されたり、このチロシナーゼ活性を阻害したり

ることができればメラニン合成を抑制することができ、シミの改善・予防が可能となる。また、上述のメラニンの産生以外にも、顔面の血流不全によるくすみもシミの原因であるとさえられている<sup>10</sup>。

このシミを改善・予防する食品摂取成分としては、ビタミンC、L-システィン、コウジ酸などの効果が知られています。コウジ酸に関しては、肝臓への影響の観点から2003年以降使用が中止されたものの、ビタミンC、L-システィンを配合した食品やサプリメントは多く市販されています。

我々はカシストンアントシアニンのシミに対する予防・改善を示唆する効果を得たので、以下、カシストンアントシアニンのシミに対する作用について概説する。

カシスは欧洲で消費量の多いペリー果実であり、収穫に含まれるボリフェノールの一一種であるD3G (アントシアニンはデルフィニジン-3-グルコシド), D3R (デルフィニジン-3-ルチノシド), C3G (シアニジン-3-グリコシド)。

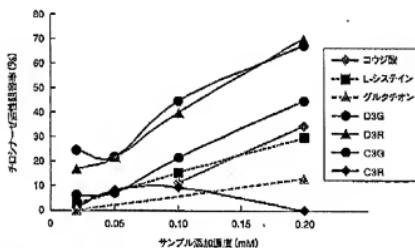


図11 カシスアントシアニンのチロシナーゼ活性阻害作用  
(文献4より一部改変) (7)

テシオニーゼ、H-バクモ酸にDOD、D9R、C3G、C3R、対照としてコウジ酸、L-システィン、グルタチオンを0.025~0.2mM濃度で、生成されるドーバクロム量を測定した。カシスアントシアニン共済作用のドーバクロムを100として、その生成量と比較することでテシオニーゼ活性阻害率を算出した。

**Exhibit A**  
page 3

## 6. 食品供給成分のシミ、シワの改善と予防効果

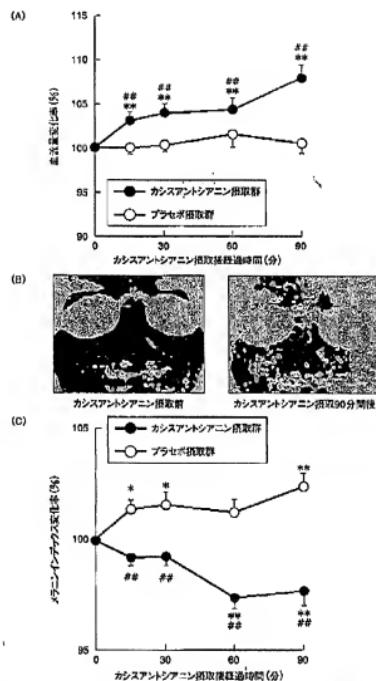


図2 カシスアントシアニン摂取による顔面血済とメラニンインデックスの変化

(文5より一部改変して引用) \*は統計学的有意差

(A) カシスアントシアニン摂取後の顔面皮膚変化率、(B) 負担的な顔面皮膚変化率イメージ、(C) カシスアントシアニン摂取前後のメラニンインデックス変化率  
摂取前値との比較: \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, プラセボ群との比較: # p < 0.05, 平均値±標準誤差

## 特許 皮膚老化と関連性食品



図3-1 カシスアントシアニンのシミ改善・予防効果板図

ルコシド), C3R (デルフィニジン-3ルチノシド) で構成されている。アントシアニンは主に胃腸と小腸上部から吸収され末梢循環を改善することが知られている<sup>10</sup>。したがって、カシスアントシアニンを経口摂取することにより、末梢循環不良による肌の赤みの低下などで生じるくすみに対して有効である可能性が考えられる。同時に、チロシナーゼ阻害活性が認められたため、カシスアントシアニンのシミに対する作用について検討した。

チロシナーゼを用い、D3G, D3R, C3G, C3R を各々 0.025~0.2mM 沸騰した際のドーパから生成されるドーパ-1コム量をサンプル無添加時の生成量と比較評価した<sup>11</sup>。D3G, D3R, C3G, C3R 沸騰時のチロシナーゼ活性阻害率は、0.2mM D3G は 67.5%, 0.2mM D3R は 70.1%, 0.2mM C3G は 45% とコウジ酸ペルシスチンより高いチロシナーゼ阻害活性を示した(図1)。

以上のことから、ヒトでのシミ改善・予防する効果を検討した。30~45歳の健常女性被験者 23 名にカシスアントシアニン 50mg を含む飲料 100mL をカシスアントシアニンを含まない飲料 100mL とを並び換擲するクロスオーバー二重盲検試験を行い、

摂取後の顔の血流量変化をレーザーップラー血流計で、内眞角下部のメラニンインデックスをメグザメーター-MDI8で測定し、群間で比較した。その結果、カシスアントシアニン摂取群はブラセボ群と比較して摂取 15 分後より顔の血流量が有意に増加し、メラニンインデックスが有意に低下<sup>12</sup>を示した。この結果から、カシスアントシアニン摂取により、皮膚色が薄くなることが示された(図2)。しかし、このヒト試験は單回摂取試験であるため、今後長期摂取による後続が望まれる。

以上の結果をまとめると、摂取したカシスアントシアニンが吸収され、メラノサイトに作用し、チロシナーゼ活性を阻害することと血流改善作用によりくすみを改善することにより、シミの改善・予防に働くことが期待できる(図3)。

## 2 シワの改善と予防効果

シワは、生理的老化による乾燥と細胞の機能低下で起こるコラーゲン線維、弾性線維などの細胞外マトリクスの低下によつて組織が変形することで発生する。また、光老化においては紫外線に曝露されること

日立原町電子工業(株) ■ 微小循環モデル測定装置 ■

1/1 ページ

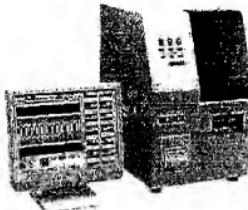
MCFAN Micro Chemical Array Flow Analyzer

装置外観

赤血球変形能、白血球活性度が一目で観察できます。  
血液の流れを観察できます！

MCFANは毛細血管を拡張し、簡便な操作で血液の流れを直接観察・記録が  
出来る装置です。予防医学や健康食品、製薬関連の研究開発用として、お役立て下さい。

エムシーファン  
(MCF300)



装置に関するお問合せは  
株式会社エムシー研究所へ  
<http://www.mclab.co.jp/>

NEXT>

Copyright © Hitachi Horimachi Electronics Co., Ltd. 1999, 2000. All Rights Reserved.

ホームへ

□ このページの最初に戻る

EXHIBIT B

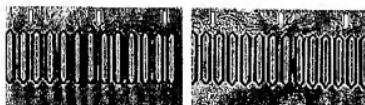
page 1

## MCFAN Micro Channel Array Flow Analyzer

## 装置の特長

## 特長

- 毛細血管を模倣したシリコンチップ流路にて、血液の流れを直接モニターで観察できます。



サラサラ状態

ドロドロ状態

※本実験: 三本ヘモリオフロー+血栓網

- 流路各血流が完結する遷移時間を測定できます。
- 流路各遷移する輪郭の変形状態をモニターで観察できます。

## 用途

- 赤血球変形性の観察
- 白血球活性度(粘着性)の観察
- 微小循環異常の観察

## シリコンチップ

- 直径幅4μm~7μmを標準チップとし、目的に合わせて選択できます。
- 流路形状をカスタムデザインする事により、装置の応用範囲が広がります。

&lt;BACK NEXT&gt;

Copyright (c) Hitachi Haranachi Electronics Co.,Ltd. 1999, 2005 All Rights Reserved.

ホームへ

▲ このページの最初に戻る

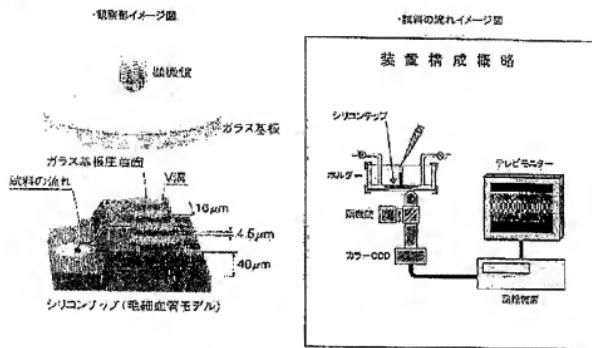
EXHIBIT B  
page 2

日立原町電子工業(株) ■ 微小循環モデル測定装置 ■

1/1 ページ

MCFAN Micro Channel Array Flow Analyzer

## 測定原理



&lt;BACK NEXT&gt;

Copyright© Hitachi Hitachi Electronics Co.,Ltd. 1999, 2000. All Rights Reserved.

▲ このページの最初に戻る

EXHIBIT B  
page 3

日立原町電子工業(株) ■ 极小循環モデル測定装置 ■

1/1 ページ

**MCFAN** Micro Channel Array Flow Analyzer

测定事例

サラサラ状態

ドロドロ状態



水流が循環蓄積モデルを  
スムーズに流れている状態

水流が循環蓄積モデルに  
凝集している状態

<BACK NEXT>

Copyright© Hitachi Hamauchi Electronics Co. Ltd. 1996, 2005. All Rights Reserved.

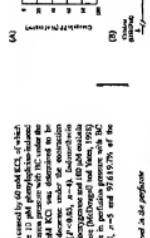
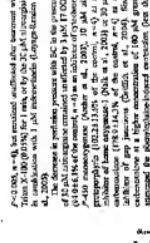
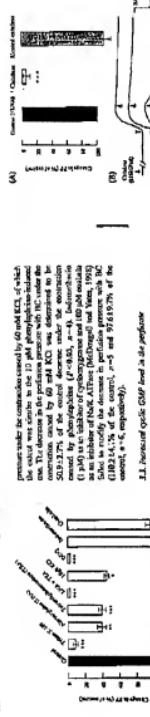
▲ このページの最初に戻る



EXHIBIT B  
page 4







3). The specific GMP levels in the plasma of the rat and the addition of the adenosine nucleotides to the plasma of the rat were measured by the radioimmunoassay technique. The results are shown in Table 1. The plasma GMP levels in the rat were measured at a basal level of 50.71 ± 1.1 pmoles/0.07 ml plasma (n = 6) and after the injection of 100 µg/kg of GRF (n = 6) at 25.5 µg/ml. The GMP levels were significantly lower with 1.3 and 2.5 nM GRF at the basal levels in the presence of 50.71 pmoles/0.07 ml plasma (n = 6) and after the basal cyclic GRF.

| Treatment   | Relative amount of NO <sub>2</sub> |
|---|------------------------------------|
| Control (1)   | 1.00                               |
| 2. 100 ppm NO   | ~1.05                              |
| 3. 100 ppm NO + 100 ppm NO <sub>2</sub>                                       | ~1.25                              |
| 4. 100 ppm NO + 100 ppm NO <sub>2</sub> + 100 ppm O <sub>3</sub>              | ~0.98                              |
| 5. 100 ppm NO + 100 ppm NO <sub>2</sub> + 100 ppm O <sub>3</sub> + 100 ppm NO | ~0.75                              |



11. Pharmacological analysis of the adrenoreceptors involved in the regulation of rat liver  $\beta$ -ketothiolase activity. In a previous communication (Liu et al., 1991) we reported that a concentration of 1  $\mu$ M of the peptide phorbol ester  $\beta$ -D-glucuronide (PGE) inhibited the  $\beta$ -ketothiolase activity of rat liver homogenates. In the present work, we found that this concentration of PGE decreased the  $\beta$ -ketothiolase activity of rat liver homogenates by 50%. This concentration of PGE was able to inhibit the  $\beta$ -ketothiolase activity of rat liver homogenates by 50%.

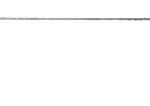
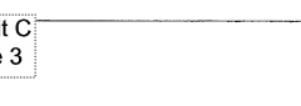


Exhibit  
page



**Exhibit C**  
page 3



chromatography, leading to no sequence and DNA sequence discrepancies, probably due to the different methods used to determine the sequence of the DNA in the two studies. We have also analysed the sequence of the *hsp70* gene in *hsp70* and *hsp70* mutants and found no sequence differences between the two genotypes. The *hsp70* gene is probably under the control of a promoter located in the *hsp70* gene, and the *hsp70* promoter may play a positive role in the expression of the *hsp70* gene.

10

**Exhibit C**  
page 5

第3回(平成16年度)BioFuture Research Encouragement Prize 研究奨励賞受賞  
別部門賞 優秀生(博士課程の部)

カシス (*Ribes nigrum* L.) 抽出物による末梢血管抵抗低下機序

○倉重忠子<sup>1,2)</sup>、Renzo Loyaga<sup>3)</sup>、松本 均<sup>2)</sup>、徳永隆久<sup>2)</sup>、東 洋<sup>1)</sup>  
(<sup>1</sup>東京医大・生材研・制御、<sup>2</sup>明治製菓・食料健康総合研、<sup>3</sup>東京医大・医・産婦人科)

【目的】「カシスポリフェノール(以下BCと記す)」は、カシス還緑果汁を粉末状にした機能性食品素材である<sup>1)</sup>。BCの効能による視覚機能改善効果<sup>2)</sup>などに末梢血管抵抗効果<sup>3), 4)</sup>が確認されているが、作用機序は不明である。BCに(catechinsidin-3-glucoside (D3G), cyanidin-3-glucoside (C3G)、およびcyanidin-3-rutinoside (C3R)の4種のアントシアニン)が含まれているので、BCのラット後肢末梢抵抗血管抵抗作用機序を詳細に解析することも、4種のアントシアニンが効果についても併せて検討した。

【方法】結果ラット内臓筋肉内挿入したニューキーを介して末梢ケラチン液を定流速灌流、遠位圧の変化を記録した。Phenylephrine (10<sup>-6</sup> M) 誘発収縮下にBCを添加する遠位圧は徐々に低下した(Fig.1)。同作用は濃度依存的で(Fig.2)、cyclic GMP産生増加を伴っており、血管内膜除去後には消失した。さらに同作用は、一酰化窒素合成酵素阻害剤(nitroarginine)と群接着K<sup>+</sup>チャネル阻害剤(tetraethylammonium)との併用またはnitroarginine+cathepsinの併用により完全に阻害された。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理によってBC作用に類似の遠位圧低下が観察され、catalaseならびにtetraethylammoniumはこれを抑制した。また、nitroarginine+cathepsin、4-aminopyridine、charybdotoxin + apaminによって部分的に抑制された。作用強度は異なるもののアントシアニンは何れも遠位圧低下作用を示し、アントシアニン作用の和はBC作用に匹敵した。また、主要アントシアニン、D3GなどはC3Rの作用と同様、nitroarginine + tetraethylammonium またはnitroarginine + catalaseにより阻止された。

【結論】BCの末梢血管抵抗低下作用は血管内皮依存性でありNOおよび過分岐因子(EDF)産生・血管の増加を介して発現されることが示唆された。さらに、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>がEDFの有力候補物質と考えられ、種類の異なる複数のK<sup>+</sup>チャネルを活性化する結果、過分岐と末梢血管抵抗をもたらす可能性が示唆された。BCの末梢血管抵抗低下作用において4種のアントシアニンが主要な役割を果たしている可能性が示唆された。

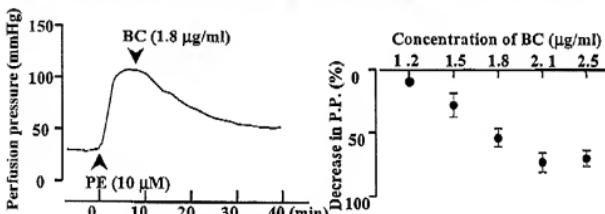


Figure 1. A sustained and progressive decrease in the perfusion pressure produced by blackcurrant concentrate (BC) in a concentration of 1.8 $\mu$ g/ml during the contraction caused by 10 $\mu$ M phenylephrine (PE).

Figure 2. Concentration-dependent decrease in the perfusion pressure with blackcurrant concentrate (BC) in the hind limb perfusion model of the rat.

- 1) Matsunoto H, Hamamra S, Kawakami T, Sato Y & Hirayama M (2001). J. Agric. Food Chem. 49, 1541-1545.
- 2) Matsunoto H, Nakamura Y, Hirayama M, Yoshihiko Y & Ooboshi K (2002). J. Agric. Food Chem. 50, 5034-5037.
- 3) Matsunoto H, Takanami E, Iwasaki-Kurashige K, Osada T, Kusumura T & Hamamra T (2003). Eur. J. Appl. Physiol. (in press).
- 4) Takanami E, Kurashige JK, Matsunoto H, Nagasawa T, Ueda C, Kitamura A, Osada T, Kusumura T & Hamamra T (2003). J. Jpn Coll Angiol 43, 331-334.
- 5) Takanami E, Kurashige JK, Matsunoto H, Inoue T, Osada T, Okubo M & Hamamra T (2004). Biomed Thermol (Tokyo) 23, 194-202.

Exhibit C  
page 6